

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

## 醋酸棉酚对小鼠、大鼠及人肿瘤 细胞系作用机制的分析

张敬方·李静波·袁菊

(基础医学研究所, 北京)

不少实验表明, 棉酚除具有抗生育作用外, 还有抗肿瘤作用, 其中包括动物肿瘤、人体肿瘤以及体外的恶性细胞系<sup>[1~10]</sup>。本研究旨在比较各种细胞系对棉酚的敏感性及其抗肿瘤作用的可能机制。

### 材 料 和 方 法

一、细胞系及其培养 实验用细胞系计有张氏大鼠肝癌细胞P3(美国Texas大学医学院张伯毅教授赠)、小鼠骨髓瘤细胞BW5147、SP2/0、人体子宫颈癌HeLa细胞、人骨髓瘤HMY细胞、以及小鼠骨髓瘤细胞和兔网织红细胞的胞质杂交瘤BW-RR28细胞<sup>[11]</sup>。上述细胞系皆培养于含20%小牛血清的1640培养液中。

二、药物 醋酸棉酚由本院药研所提供, 用前以上述培养液配制成所需浓度。

#### 三、实验方法及观察指标

1. 细胞敏感性: 分别在每毫升培养液中加入0、5、10、20、40微克醋酸棉酚, 24小时后计数。使实验组细胞数减少到对照组细胞数的50%的棉酚浓度为有效值。
2. 细胞生长曲线: 按文献<sup>[12]</sup>进行。
3. 恢复实验: 按文献<sup>[13]</sup>进行。
4. <sup>3</sup>H-胸腺嘧啶核苷参入试验: 按文献<sup>[14]</sup>进行。
5. 乳酸脱氢酶同工酶电泳分离: 按文献<sup>[15]</sup>进行。

### 结 果 与 讨 论

#### 一、各种细胞系对棉酚的敏感性

各种细胞系对棉酚敏感性并不相同, P3、BW5147、HeLa和BW-RR28对棉酚较为敏感, 而HMY与SP2/0对棉酚不敏感(附表)。如果选出一个敏感与一个不敏感的细胞系绘制生长曲线(图1), 可看出P3的生长可受到棉酚的明显抑制, 而SP2/0在同样条件下(20 $\mu$ g/ml)其生长不受明显的影响。然而, 尽管有的细胞系对棉酚较为敏感, 只要将棉酚从培养液中撤除, 细胞仍可缓慢恢复生长。这一结果表明在一定浓度下(40 $\mu$ g/ml)与一定的作用时间(72小时), 棉酚的作用是可逆的, 与前文<sup>[6]</sup>相一致。

#### 二、棉酚对<sup>3</sup>H-胸腺嘧啶核苷参入的影响

为了探索棉酚对DNA合成的影响, 我们以40 $\mu$ g/ml醋酸棉酚处理P3和BW5147细胞。发现经处理8、24、48小时以后, 胸腺嘧啶核苷参入量明显低于对照组, 甚至24小时后, 棉酚处理的P3细胞的胸腺嘧啶核苷参入完全停止。(图2)。

#### 三、棉酚对乳酸脱氢酶同工酶的影响

从棉酚作用下P3与BW5147乳酸脱氢酶同工酶电泳(图3)可以看出对照组与实验组的乳酸脱氢酶同工酶的成分没有任何差异。提示棉酚可能不是通过影响P3、BW5147细胞的乳酸脱氢酶同工酶而抑制细胞生长的。

表 1 棉酚对不同细胞系的作用比较  
Table 1 Effect of gossypol on different cell lines *in vitro*

Cell line	Gossypol( $\mu\text{g/ml}$ )	Sensitivity
P3	20	++
BW	20	++
HeLa	20	++
BW-RR <sub>11</sub>	20	++
SP2/0	40	+
HMY	40	+

Reported as gossypol concentration which reduces cell number 50% of that of control. Sensitivity is arbitrarily established as follows: ++, less than  $20\mu\text{g/ml}$  gossypol concentration; +, more than  $40\mu\text{g/ml}$  gossypol concentration

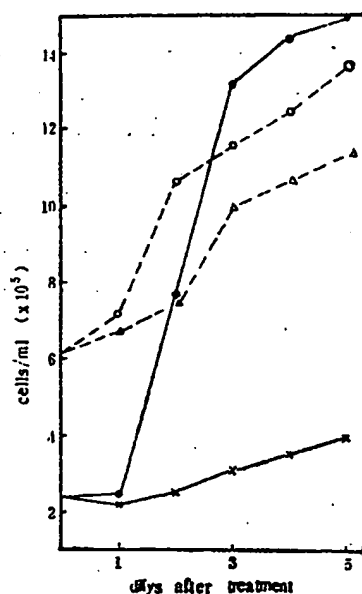


图 1 棉酚对大鼠肝癌细胞 P3 与小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 生长的影响

Fig 1 Effect of gossypol on the growth rate of P3 cell and SP2/0 cell. It was estimated by measurement of the cytometry  
P3: --- control; x-x gossypol ( $20\mu\text{g/ml}$ )  
SP2/0: ○-○ control; △-△ gossypol ( $20\mu\text{g/ml}$ )

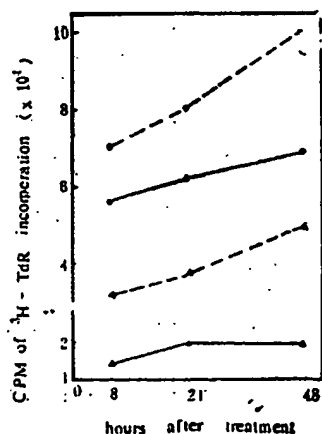


图 2 棉酚对大鼠肝癌细胞 P3 和小鼠骨髓瘤细胞 BW 5147 DNA 合成的作用

Fig 2 Effect of gossypol on the DNA synthesis of P3 cell and BW cell. Cells were continuously exposed to gossypol ( $40\mu\text{g/ml}$ ) throughout the course of the experiment.  $^3\text{H-TdR}$  ( $1\mu\text{Ci/ml}$ ) and gossypol were added to the dishes. After incubation of 8, 24, 48h, the DNA synthesis of all cells was estimated by CPM of  $^3\text{H-TdR}$  incorporation  
P3: --- control; ▲-▲ gossypol ( $40\mu\text{g/ml}$ )  
BW: ○-○ control; △-△ gossypol ( $40\mu\text{g/ml}$ )

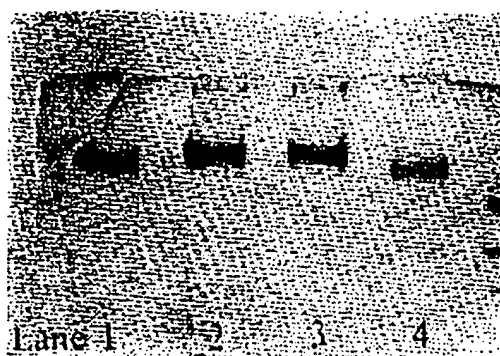


图3 小鼠骨髓瘤细胞 BW5147 和张氏肝癌细胞的乳酸脱氢酶同工酶谱

Fig 3 Isoenzyme pattern of P3, BW5147 cell lines, PAGE for 3h, 3wcek constant power. Lan1, P3 treated with gossypol (40 $\mu$ g/ml). Lan2, BW5147 control. Lan3, BW5147 treated with gossypol (40 $\mu$ g/ml). Lan4, P3 control.

由此可以得出两点结论：①各种细胞系对棉酚的敏感性是不同的。例如在20 $\mu$ g/ml醋酸棉酚作用24小时可明显抑制大鼠肝癌细胞、小鼠骨髓瘤细胞系BW5147、人子宫颈癌HeLa细胞以及小鼠骨髓瘤细胞和兔网织红细胞的杂交瘤细胞BW-RR28，而小鼠骨髓瘤细胞系SP2/0以及人骨髓瘤细胞系HMY则需用40 $\mu$ g/ml才出现明显的生长抑制(附表)。另外，从20 $\mu$ g/ml醋酸棉酚对羊水细胞的生长无明显抑制作用<sup>[8]</sup>，正常肺成纤维细胞对棉酚也不敏感<sup>[11]</sup>看来，细胞对棉酚的敏感性并无种属差异，而似乎提示正常细胞系对棉酚略有抵抗性<sup>[12,13]</sup>。②实验结果提示棉酚可以较明显地抑制<sup>3</sup>H-胸腺嘧啶核苷的细胞参入，似可特异性地抑制细胞的DNA合成。我们这一结果与Wang等<sup>[14]</sup>报道一致，但与其他学者的结果不全一致<sup>[10,15]</sup>，他们认为棉酚是通过抑制细胞乳酸脱氢酶同工酶而起作用的。我们实验结果提示棉酚并不是通过抑制细胞的乳酸脱氢酶同工酶起作用的。或许所用细胞系不同，各实验室条件不同，所得结果不一，有待进一步探讨。

### 参 考 文 献

1. 薛社普, 等. 男用节育药棉酚的实验研究. 人民卫生出版社 1983年.
2. Вермель, ЕМ, И Кругляк СА. Противоопухолевая активность госсипола в опытах на перевиваемых Опухолях. Вопросы онкологии 1983; 9(12):39
3. Ёрухинов ЛС. Лечение опухолей мочевого пузыря госсиполом и ионолом в сочетании с хирургическим вмешательством. Вопросы Онкологии 1966; 12(2):29
4. 顾振东, 等. 棉酚治疗恶性肿瘤二十四例初步小结. 棉酚、醋酸棉酚、甲酸棉酚研究资料汇编. 山东省中医药研究出版社 1980:374
5. 黑兰芬, 等. 肿瘤病人口服棉酚后睾丸活检组织的电镜观察. 中华医学杂志 1981; 61:527
6. 上海, 江苏, 浙江锦棉片抗肿瘤协作小组. 锦棉片治疗恶性肿瘤临床报告. 新医学 1982; 13:183
7. 韩美玲, 等. 棉酚治疗子宫内膜异位症和子宫肌瘤的临床观察及其作用部位. 中西医结合杂志 1982; 2(3):150
8. 章静波, 等. 醋酸棉酚对体外子宫癌细胞的作用. 实验生物学报 1983; 16(2):177
9. 刘 裕, 等. 醋酸棉酚对HeLa细胞作用的透射电镜和扫描电镜观察. 解剖学报 1985; 16(1):95
10. 章静波, 等. 左旋、右旋和消旋棉酚对HeLa细胞杀伤作用比较. 中国医学科学院学报 1985; 7(5):383
11. 薛社普, 等. 兔网织红细胞胞质因子对小鼠骨髓瘤细胞恶性调控的研究. 中国医学科学院学报 1986; 8(5):339
12. Rao, et al. Antitumor effects of gossypol on murine tumors. Cancer chem. Pharm. 1985; 5:20
13. George P. Tuszyński and guilio cossu. Differential cytotoxic effect of gossypol on human melanoma, Colon carcinoma, and other tissue culture cell lines. Cancer Res 1984; 44:768
14. Wang Yongchao and Potu N. Rao. Effect of gossypol on DNA synthesis and cell cycle progression of mammalian cells in vitro Cancer Res 1984; 44:35
15. Floridi A, et al. The effect of the association of gossypol and lonidamine on the energy metabolism of ehrlich ascite tumor cells. Experimental and Molecular Path 1983; 38:322
16. Sang Hie Kim, et al. Gossypol, a hyperthermic sensitizer of HeLa cells. Cancer Res. 1985; 45:6338

# of Gossypol in Mice, Rats and Human Tumor Cell Lines and Its Possible Mechanism

Zhang Jingfang, Zhang Jingbo and Yuan Ju

(Institutes of Basic Medical Sciences, Beijing)

Experimental studies on cytotoxic effect of gossypol in mice rats and human cell lines and its possible mechanism were reported. Our results showed that P<sub>3</sub>, BW<sub>5147</sub>, HeLa and BW-RR<sub>28</sub> were cell lines sensitive to gossypol, while SP2/0 and HMY were less sensitive.

## 白细胞介素 2 对刀豆蛋白 A 诱导细胞的调节作用(简报)

肿瘤研究所免疫室 吴易元 苏颖\*

白细胞介素 2(IL2 或 TCGF)促进 T 细胞生长、增殖的功能早已肯定,但对 IL2 的免疫调节功能,尚属研究阶段。文献报道均为通过 IL2 增殖 T 辅助细胞或 T 抑制细胞,间接来阐明 IL2 的调节作用。至今尚未见到较直接的方法。此外,研究免疫调节,希望获得一个能同时提供正反两种不同功能的实验模型,以便观察免疫调变剂对两种不同免疫功能的调节作用。根据以上两个月的,本文建立了一个实验体系,不仅排除了 IL2 促增殖功能的干扰,且能同时诱导出促进活性和抑制活性两种不同功能的细胞。采用此模型,较直接地观察了三种不同来源的 IL2,对 65 例正常人外周血刀豆蛋白 A 诱导细胞(CIC)的调节作用。结果表明,当 CIC 在体外培养 2 小时,主要表现出抑制活性(17/24),而小部份显示促进活性(7/24)。然后将两组分别用人 IL2 及 MLA144-CM(分泌 IL2 的瘤株)处理,发现在多数情况下,IL2 能逆向调节 CIC 活性,使原有的抑制活性减弱,或由抑制活性转向促进活性。反之,若为促进活性,IL2 能减弱促进活性或调节为抑制活性。此种逆向调节称为阳性反应。少数可出现正向调节,即加强原有的活性,称为阴性反应。也有小部份调节幅度较小(<20%),属无反应。按此三种调节类型分组,则 24 例 CIC 在体外培养 2 小时后,经 MLA144-CM 调节的结果为:14/24(58.3%)阳性反应,7/24(29.2%)无反应,3/24(12.5%)阴性反应。阳性反应居多数( $P < 0.01$ )。人 IL2 调节后为:11/24(45.8%)阳性反应,6/24(25.0%)无反应,7/24(29.2%)阴性反应。仍以阳性调节反应为主( $P < 0.05$ )。21 例 CIC 在体外培养 2 小时后,则以促进活性为主(14/21),少数呈抑制活性(7/21),用上述两种 IL2 处理后,同样,均以阳性反应为主( $P < 0.01$ )。MLA144-CM 为:15/21(71.4%)阳性反应,2/21(11.8%)无反应,4/21(19.0%)阴性反应。人 IL2 调节后:11/21(52.4%)阳性反应,8/21(28.6%)无反应,4/21(19.0%)阴性反应。此外,20 例以 MLA144-CM 的纯化制剂代替粗制剂,获得了类似的结果。因此,采用本文建立的实验体系,较直接地观察到 IL2 具有对 CIC 的调节功能。

本文于 1986 年 4 月 23 日收到 \*本室进修生

Sot  
R97.7  
A18  
V.8#6  
1986

# 中国医学科学院学报

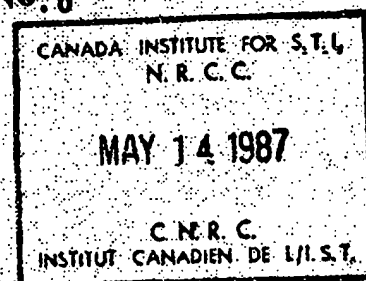
ACTA ACADEMIAE MEDICINAE SINICAE

第 8 卷  
Vol. 8

第 6 期  
No. 6

6

1986



中国医学科学院  
中国协和医科大学